

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Manusia memerlukan makanan untuk kelangsungan hidup, namun ketersediaannya tidak selalu pasti (Longo, V. D., and Mattson, M. P., 2014). Sebagai bentuk adaptasi terhadap kondisi tersebut, manusia mengembangkan pola makan dengan jeda waktu tanpa makan, yang sekarang disebut sebagai *intermittent fasting* atau puasa berselang (Horne, B. D., and Kopp, S. J., 2015).

Intermittent fasting merupakan pola makan melibatkan siklus antara waktu puasa dan waktu makan. Artinya, orang yang mengikuti pola ini akan bergantian antara tidak makan dan makan dalam periode waktu tertentu. Pola ini tidak menentukan jenis makanan yang harus dimakan, tetapi lebih fokus pada pengaturan waktu puasa dan makan (Shalabi et al., 2023). Akhir-akhir ini, praktik *intermittent fasting* semakin mendapatkan popularitas karena dipercaya memberikan manfaat kesehatan (Bass, J., and Takahashi, J. S., 2020). Metode ini menarik perhatian lebih banyak, baik di bidang kesehatan manusia maupun penelitian ilmiah. *Intermittent fasting* telah terbukti berdampak signifikan pada metabolisme dan umur panjang di berbagai spesies, termasuk manusia, tikus, dan mencit. Intervensi diet ini dinilai mampu memengaruhi berbagai aspek biologis melalui mekanisme molekuler yang kompleks, seperti metabolisme energi, autofagi, dan stres oksidatif. (Mattson et al., 2017).

Banyak penelitian secara *in vivo* membuktikan bahwa *intermittent fasting* berkontribusi pada perpanjangan umur dan peningkatan kesehatan. Namun penggunaan hewan uji dalam penelitian mulai dibatasi. Pembatasan ini didorong oleh meningkatnya kepedulian terhadap kesejahteraan hewan yang digunakan serta kesadaran yang lebih besar terhadap hak-hak hewan (Giacomotto dan Seagalat, 2010; Pandey dan Nicholas, 2011). Berdasarkan prinsip 3R (Reduction, Replacement, Refinement) salah satu pendekatan yang dapat dilakukan yaitu penggunaan hewan uji alternatif selain mamalia.

Lalat buah atau *Drosophila melanogaster* telah banyak digunakan sebagai hewan uji alternatif dalam pengujian *in vivo* termasuk yang berkaitan dengan *intermittent fasting* (Zhang, S., et al 2018). Penggunaan *D. melanogaster* memiliki beberapa keuntungan, seperti siklus hidup yang singkat, mudah dipelihara dan biaya yang lebih rendah dibandingkan hewan uji lainnya (Nainu et al., 2022). Selain itu, sekitar 75% gen pada *D. melanogaster* homolog dengan gen pada manusia, tidak memerlukan kode etik, dan memiliki masa hidup yang relatif singkat sehingga t waktu penelitian (Miryozan et al., 2019; Pandey dan Nicholas,



nelitian mengenai IF telah dilaporkan dapat memperpanjang umur (Catterson, J.H., et al, 2018). Namun, efek secara molekuler yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan belum banyak ditelusuri. Oleh karena itu, penelitian ini dilakukan orasi lebih lanjut pengaruh IF terhadap *D. melanogaster* secara

molekuler

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan di atas, maka rumusan masalah dari penelitian yaitu bagaimana pengaruh *intermittent fasting* terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh *intermittent fasting* terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen.

1.3.2 Tujuan Khusus

Penelitian ini bertujuan untuk menelusuri pengaruh *intermittent fasting* terhadap gen *atg5*, *atg8a*, *cat*, *srl*, *dilp2*, *tom40*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Secara Teoritis

Penelitian ini diharapkan mampu menambah ilmu pengetahuan dan sebagai bahan bacaan yang ingin mengetahui efek dari *intermittent fasting* terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen.

1.4.2 Secara Aplikatif

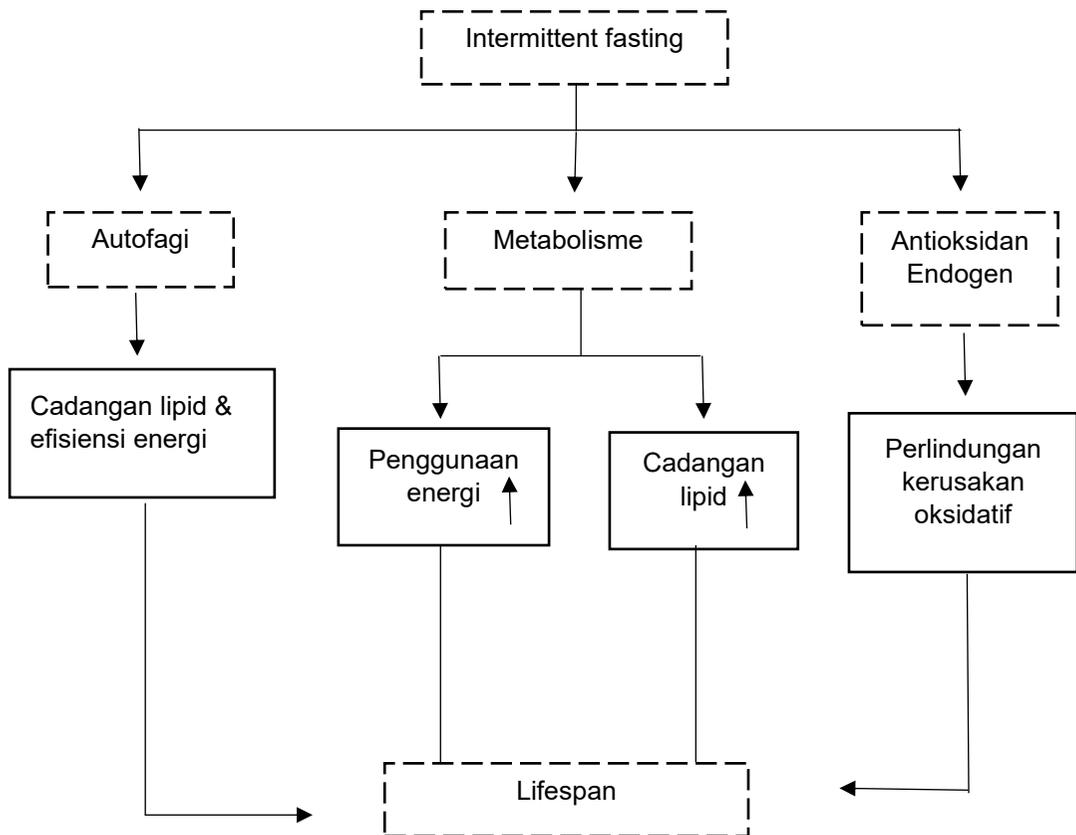
Menambah data dan informasi tentang pengaruh *intermittent fasting* terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen.

1.4.3 Bagi Instansi Penelitian

Penelitian ini dapat dijadikan sebagai sumber referensi yang dapat dijadikan pedoman dan bahan masukan dalam pengembangan penelitian.



1.5 Kerangka Teori



Keterangan:

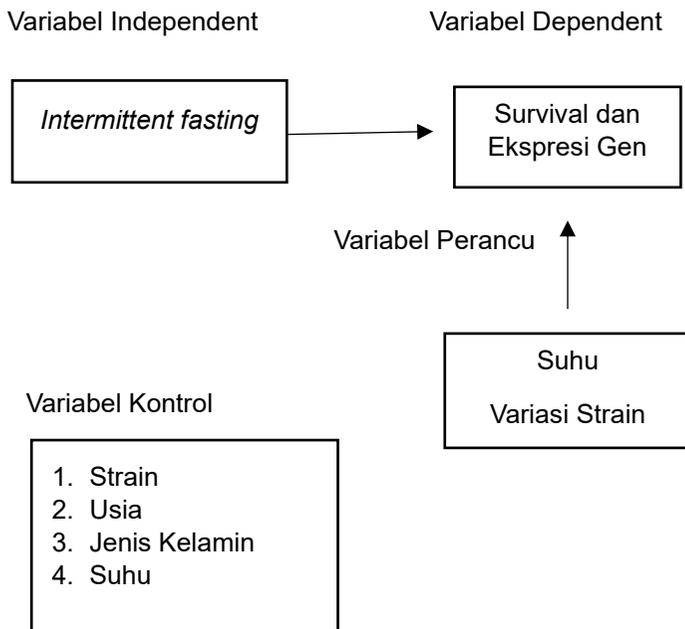
----- = Penelitian dilakukan

_____ = Penelitian tidak dilakukan

Gambar 1. Kerangka Teori



1.6 Kerangka Konsep



Gambar 2. Kerangka Konsep

1.7 Hipotesis

Berdasarkan rumusan masalah yang telah disebutkan di atas, maka hipotesis penelitian ini adalah:

- H0 : *Intermittent fasting* tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen *Drosophila melanogaster*
- H1 : *Intermittent fasting* memiliki pengaruh signifikan terhadap terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen *Drosophila melanogaster*.



1.8 Definisi Operasional

Operasional variabel merupakan penjabaran dari variabel penelitian, dimensi dan indikator yang digunakan untuk mengukur variabel tersebut. Berikut definisi dari variabel yang digunakan dalam penelitian ini:

Tabel 1. Definisi Operasional

No	Variabel	Defenisi	Alat Ukur	Cara Ukur	Hasil	Skala Ukur
Variabel Independent						
1	Intermittent fasting	Merupakan pola makan melibatkan siklus antara waktu puasa dan waktu makan. Artinya, orang yang mengikuti pola ini akan bergantian antara tidak makan dan makan dalam periode waktu tertentu (Shalabi et al., 2023).	Vial	Mengatur jadwal makan dan pola puasa	Tabel pengamatan	Jam dan Hari
Variabel Dependent						
2	Survival	Tes yang digunakan untuk menilai kelangsungan hidup suatu organisme atau populasi dalam jangka waktu tertentu (Partridge, L et al., 2005).	Vial. Timer	Catat lalat yang masih hidup selama periode pengamatan	Tabel pengamatan	Menit
		Ekspresi gen adalah	Real-Time	Ekstraksi RNA dari	Tingkat ekspresi	Rasio relatif



		proses di mana informasi dari DNA diubah menjadi produk fungsional, terutama protein, melalui dua tahap utama: transkripsi (pembuatan RNA dari DNA) dan translasi (pembuatan protein dari RNA) (Larson DR., et al 2009)	PCR	sampel, transkripsi balik menjadi cDNA, amplifikasi gen target.	gen berdasarkan intensitas sinyal PCR.	ekspresi gen
--	--	---	-----	---	--	--------------



BAB II METODE PENELITIAN

2.1 Desain/Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium. Penelitian Desain penelitian melibatkan eksperimen terkontrol untuk menguji pengaruh *intermittent fasting* terhadap gen-gen yang berkaitan dengan autofagi, metabolisme, dan antioksidan endogen. Penelitian ini menggunakan dua kelompok utama, yaitu kelompok control yang diberi makan secara *ad libitum* dan kelompok perlakuan yang menjalani *intermittent fasting* selama 8 jam.

2.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Farmakologi-Toksikologi Fakultas Farmasi dan Laboratorium Biofarmaka LP2M Universitas Hasanuddin Makassar. Waktu penelitian dilakukan pada bulan Agustus-Desember 2024.

2.3 Populasi dan Sampel

2.3.1 Populasi

Populasi dalam penelitian ini adalah semua individu *D. melanogaster w¹¹¹⁸* yang sehat dan siap untuk bereproduksi.

2.3.2 Sampel

Sampel dalam penelitian ini adalah *D. melanogaster* yang terdiri dari jantan strain yang sama, usia 1-2 hari. Ukuran sampel 10 ekor pada masing-masing kelompok perlakuan

2.4 Kriteria Inklusi dan Eksklusi

2.4.1 Kriteria Inklusi

1. *D. melanogaster* strain *w¹¹¹⁸* jantan.
2. Usia 1-2 hari setelah eklosi.
3. Keadaan umum sehat dan aktif.
4. Penyimpanan pada suhu 25°C.

2.4.2 Kriteria Eksklusi

1. *D. melanogaster* selain strain *w¹¹¹⁸*.
2. *D. melanogaster* tidak dapat diidentifikasi secara akurat sebagai jantan atau betina.
3. *D. melanogaster* usia tua.
4. *D. melanogaster* cacat fisik.



an
bebas/*Independen*

ini menggunakan variabel bebas yaitu *intermittent fasting*.

terikat/*Dependen*

ini menggunakan variabel terikat yaitu survival dan ekspresi gen.

2.6 Instrumen Penelitian

2.6.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan gelas (Iwaki®), timbangan analitik (Sartorius®), mikroskop stereo zoom (Motic®), Gas CO², papan CO² (CO² stage), biosafety cabinet kelas II (BSC II), thermal cycler qPCR (RotorGene Q, Qiagen®), micropestle (Geneaid®), vial *Drosophila* (Biologix®), lemari pendingin, mikropipet (Dragonlab), tabung mikro (Gene Follower), serta kompor listrik (IKA C-MAG HS®).

2.6.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi agar (Swallow®, PT. Dunia Bintang Walet, No: 318509040409, Indonesia), ragi (Brewer's yeast, Health Paradise Sdn, No. 199701038799.454299-W, Malaysia), tepung jagung (Elken Healthy Food, Nawasagena Pangan Kreatif, No. 5053571020029-26, Indonesia), asam propionat (Merck, Merck KGaA, No. 79-09-4, Germany), alkohol 70%, metil paraben (Techno Pharmchem, No. 223650, India), Aqua®, *Drosophila melanogaster* jenis wild-type (*w¹¹¹⁸*), dan Universal One-Step RT-qPCR Kit (Luna®, New England Biolabs, Inc., MA, USA).

2.7 Prosedur Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui beberapa tahapan:

2.7.1 Penyiapan Hewan Uji

Hewan uji *D. melanogaster* strain *w¹¹¹⁸* dipelihara dan dikembangbiakkan dalam vial kultur yang berisi media pakan. Lalat jantan berusia 1-2 hari digunakan sebagai subjek dalam eksperimen ini.

2.7.2 Penyiapan Pakan *D. melanogaster*

Dalam pembuatan pakan *D. melanogaster* dibuat pakan normal dan pakan perlakuan:

a. Pakan normal

Pembuatan pakan normal pertama-tama ditimbang masing-masing bahan tepung jagung 7,5 g, yeast 2,5 g, agar 0,9 g, gula pasir 4,5 g, dan masukkan ke dalam gelas kimia. Kemudian ditambahkan air mineral hingga mencapai 100 mL. Setelah itu, dipanaskan di atas kompor listrik pada suhu 100°C sambil diaduk hingga kental menggunakan batang pengaduk, kemudian ditambahkan asam propionat 400 µL dan metil paraben 450 µL. Pakan didinginkan lalu dituang ke dalam vial.

b. Pakan perlakuan

Pembuatan pakan perlakuan ditimbang agar sebanyak 1% dan ahkan air secukupnya masukkan ke dalam gelas kimia. Panaskan ran sambil diaduk hingga agar larut sepenuhnya. Kemudian an campuran ke dalam vial yang telah disiapkan. Biarkan ran mendingin dan mengeras menjadi gel.



2.7.3 Uji Survival

Pengujian survival dilakukan untuk melihat efek *intermittent fasting* yang diberikan terhadap *lifespan D. melanogaster w¹¹⁸*. Terdapat beberapa kelompok uji yang digunakan yaitu kelompok kontrol yang diberikan makan *ad libitum* dan kelompok perlakuan yang ditempatkan pada media yang mengandung agar 1%. *Drosophila* di puasakan selama 8 jam (09.00-17.00 WITA), tiga kali seminggu (Senin, Rabu, Jumat). Kemudian dilakukan pengamatan (Kotzebue, R. W. 2012).

2.7.4 Penyiapan Sampel RNA

Isolasi RNA menggunakan *RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit* (Invitrogen™). Sebanyak lima ekor *D. melanogaster* yang masih hidup dimasukkan ke dalam *treff tube*. Siapkan reagen lysis buffer segar yang telah dicampur dengan *2-mercaptoethanol* dimana setiap 300 µL lysis buffer untuk setiap sampel dan ditambahkan *2-mercaptoethanol* sebanyak 1% dari total volume lysis buffer. Setelah itu, ditambahkan sebanyak 300 µL campuran tersebut ke dalam masing-masing tube sampel dan sampel lalat dihancurkan dengan menggunakan *micro pestle*. Kemudian, disentrifugasi selama 2 menit dengan kecepatan 14.000 rpm. Lisat ditransfer ke tube baru kemudian ditambahkan 300 µL etanol 70% dan divortex selama 10 detik. Selanjutnya, sampel ditransfer ke *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 15 detik dengan kecepatan 14.000 rpm. Setelah itu, ulangi proses sebelumnya selama 2 kali. Setelah itu, buang filtrat dan masukkan kembali *spin cartridge* pada tube yang sama. Tambahkan sebanyak 700 µL Wash Buffer I kedalam *spin cartridge* kemudian sentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 15 detik pada suhu ruang. Filtrat dibuang dan *spin cartridge* dipindahkan pada *collection tube* baru. Etanol 96% sebanyak 500 pada *spin cartridge*, kemudian sentrifugasi selama 15 detik pada kecepatan 14.000 rpm pada suhu ruang. Filtrat dibuang ditempatkan kembali pada *collection tube* yang sama. Proses tersebut dulangi sebanyak 2 kali.

Selanjutnya, *spin cartridge* kembali disentrifugasi dengan kecepatan 14.000 rpm selama 1 menit pada suhu ruang. Kemudian ditambahkan 40 µL RNase free water pada bagian tengah *spin cartridge* dan diulangi dengan menambahkan kembali RNase free water dalam jumlah yang sama. Inkubasi pada temperatur ruang selama 1 menit. Kemudian ditambahkan kembali 40 µL RNase free water ke dalam *spin cartridge* dan disentrifugasi selama 2 menit pada kecepatan 14.000 rpm. *Spin cartridge* dibuang dan *collection tube* yang mengandung RNA disimpan pada suhu -80°C.



Ekspresi Gen

ukuran level ekspresi gen dilakukan menggunakan real-time PCR t GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega®). Real-time PCR menggunakan satu set primer *atg5*, *atg8a*, *cat*, *srl*, *dilp2*, *tom40* tube PCR dengan volume 20 µL. Sebagai kontrol internal,

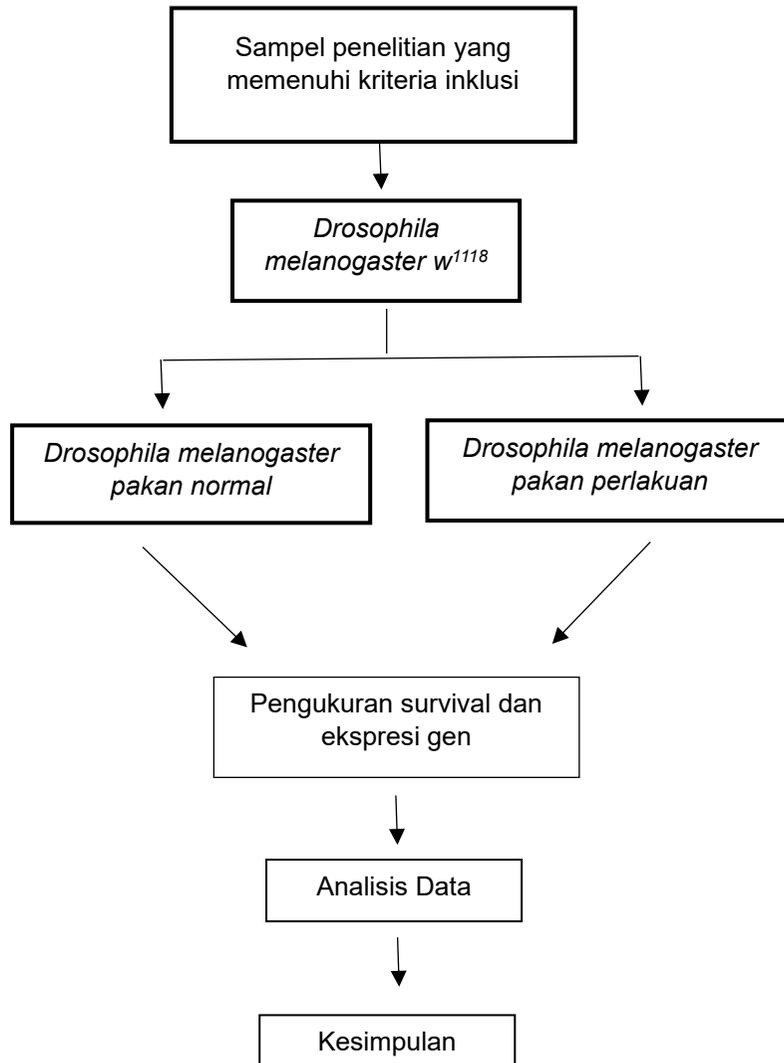
digunakan satu pasang primer protein ribosomal *rp49* yang dijalankan sesuai prosedur RT-qPCR.

Tabel 2. Sekuens primer masing-masing gen

Nama Gen	Sekuens Primer		Kondisi
	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')	
<i>atg5</i>	GTTTTGGGCCATCAAT CGGAA	TCTCCTAGTGTGTGCAACT GT	Siklus PCR : 40 siklus Hold : 37°C, 15 menit Hold2 : 95°C, 10 menit Denaturasi : 95°C, 10detik Annealing : 60°C, 30detik Extension : 72°C, 30detik
<i>atg8a</i>	TACCAGGAACATCAC GAGGA	AAACGCGGTTCTGCATGA G	
<i>cat</i>	TTCCTGGATGAGATGT CGCACT	TTCTGGGTGTGAATGAAG CTGG	
<i>srl</i>	CTCTTGGAGTCCGAG ATCCGCAA	GGGACCGCG AGCTGATGGTT	
<i>dilp2</i>	CTCAATCCCCTGCAG TTTGT	CGCAGAGCCTTCATATCA CA	
<i>tom40</i>	TGCACGTGTGCTACT ACCAG	ATTCCGCCTCTGAGACCA G	
<i>rp49</i>	GACGCTTCAGGGACA GTATCTG	AACGCGGTTCTGCATGAG	



2.8 Alur Penelitian



Gambar 3. Alur Penelitian

2.9 Analisis Data



Data hasil uji kelangsungan hidup dianalisis secara statistik menggunakan t -test. Kurva Kaplan-Meier digunakan untuk menggambarkan hidup lalat, dan analisis log-rank diterapkan untuk evaluasi perantara itu, data ekspresi gen *Drosophila melanogaster* dari hasil analisis menggunakan uji *Student's t-test*.